



TITLE:

神経細胞の形態的諸変化とその意義 : in vitro の条件下における脳組織の電子顕微鏡的研究

AUTHOR(S):

鈴木, 陽一

CITATION:

鈴木, 陽一. 神経細胞の形態的諸変化とその意義 : in vitro の条件下における脳組織の電子顕微鏡的研究. 日本外科宝函 1965, 34(2): 418-435

ISSUE DATE:

1965-03-01

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/206464>

RIGHT:

神経細胞の形態的諸変化とその意義

— in vitro の条件下における脳組織の電子顕微鏡的研究 —

京都大学医学部脳神経外科教室（指導：荒木千里教授）

鈴木 陽 一

〔原稿受付 昭和40年1月11日〕

Electron Microscopic Study of Brain Tissue under
in Vitro Condition

by

YOICHI SUZUKI

From the 1st Surgical Division and Neurosurgery, Kyoto University Medical School

(Director : Prof. Dr. CHISATO ARAKI)

INTRODUCTION

By the incubating brain slice method morphological changes of nerve cells were studied with an electron microscope, and compared with histochemical changes.

MATERIAL AND METHOD

Adult rats were decapitated to obtain the brain and slices were prepared from the cerebral cortex. Incubation was done in modified Warburg's apparatus in 4 different ways;

Experiment 1 : O_2 was used as gas phase

Experiment 2 : N_2 was used as gas phase

Experiment 3 : 2, 4-dinitrophenol (DNP) $2 \times 10^{-4}M$ was used in addition to O_2

Experiment 4 : Acetylcholine (Ach) $10^{-2}M$ and eserine $2 \times 10^{-4}M$ were used in addition to O_2

As for the incubation media, tissue culture medium (10 ml) was used in all instances except for the experiment 4 in which an additional experiment with Krebs-Ringer's solution (10ml) containing glucose $11 \times 10^{-3}M$ was done. O_2 and N_2 were passed through containers for 15 minutes prior to incubation, then incubation was done for 15, 30, 45 and 60 minutes each in the quiescence state in $30^\circ C$ with gas flow.

Obtained specimens were fixed for 2 hours in 1% osmium tetroxide containing 0.1M phosphate buffer (pH 7.2), dehydrated with ethyl alcohol, and then embedded into methacrylate. Leitz ultramicrotome for ultra-thin sectioning and Hitachi HS-6 model electron microscope were used.

Electron microscopic preparations were made at the similar depth from the surface of

slices as much as possible and several blocks were examined in each experiment.

RESULTS AND DISCUSSION

A. Normal picture of cortical nerve cells

Nucleus encircled with double nuclear membranes contained dispersed or occasionally conglomerated chromatin particles and one prominent dark nucleolus. Nissl body (endoplasmic reticulum) which was composed of ergastoplasmic-membranous sacs and associated finely granular components had a characteristic appearance in the cytoplasm. Mitochondria containing either transversely or longitudinally oriented cristae and dense bodies were scattered throughout the cytoplasm. GOLGI apparatus consisted of paired lamellar membranes, clusters of small vesicles and large vacuoles (Fig. 1).

B. Morphological changes of nerve cells in various incubations

Experiment 1

In aerobic incubation, the marked changes were first seen after 45 minutes, and by this time nerve cells maintained identical form as they are in vivo. Therefore, in other incubations, for the purpose of comparison, observations were mainly concentrated on the changes in preparations incubated for 45 minutes. Earlier developed changes were also compared to these changes (Fig. 2, 3, 4, 5 and 6).

Experiment 2

In anaerobic incubation, remarkable changes started to develop after 30 minutes. Characteristic changes were progressive increase of cytoplasmic osmiodensity, decreased osmiodensity of nucleoplasm and the disruptive process of mitochondria. There were also the pictures suggesting the rupture of the nuclear membrane and the sclerosis.

These findings indicate the same degenerative changes as observed in the light microscope, such as chromophilia, sclerosis, atrophy and cellular death. It may be thus considered that the changes were caused by the primary suppression of neuronal activity (Fig. 7, 8, 9, 10 and 11).

Experiment 3

When DNP was added, decrease of chromatin granules of nucleus, increased and gross cytoplasmic granules and severe changes of mitochondria were observed. These were similar to those seen in anaerobic incubation but lesser in degree.

DNP acts as uncoupler in the electron transport system and inhibit the formation of ATP, thus resulting in the deficiency of energy to maintain the proper form and function of cells which is considered to be the cause of these changes. The morphological difference in electron microscope between the experiments 2 and 3 may be explainable by the difference in metabolic disturbance (Fig. 12, 13 and 14).

Experiment 4

Remarkable changes of endoplasmic reticulum and mitochondria with diminution of cellular granules were recognized but the characteristic changes were in endoplasmic reticulum rupturing in some parts.

These changes seem similar to chromatolysis observed in histochemical examination. Changes may be due to the metabolic change in endoplasmic reticulum by the stimulative action of acetylcholine probably resulting rapid exhaustion of labile-RNA granules, thus developing so-called chromatolysis.

On comparison of the uses of tissue culture media and Krebs-Ringer's solution containing glucose 11 mM, the latter caused the severer change (Fig. 15, 16, 17, 18 and 19).

SUMMARY

- 1) In aerobic incubation, nerve cells retained nearly normal picture until 45 minutes.
- 2) In anaerobic incubation with N_2 , nerve cells started to show changes in 30 minutes; i. e. changes in mitochondria, increased electron density of cell body, partial rupture of nuclear membrane and contraction of nerve cells a series of degenerative changes corresponding to light microscopic changes known as chromophilia, sclerosis and cellular death.
- 3) In case of the addition of DNP, the changes were similar to those seen in anaerobic incubation although they were lesser in degree.
- 4) When stimulation was given by acetylcholine, severe changes were noted on endoplasmic reticulum and mitochondria, a finding similar to chromatolysis in light microscope. On comparison of the use of tissue culture media with Krebs-Ringer's solution containing glucose 11 mM, the latter displayed severer changes.
- 5) It became clear that in two types of degenerative change of nerve cells, leading to the cellular death; i. e. the chromophilia and the chromatolysis, the former may be caused by the primary suppression and the latter by the hyperactive exhaustion.

結 言

神経組織、特に神経細胞が体内で最も複雑な機能を持つ細胞のひとつであり、そこに示される形態学的変化もまた複雑であるという理由から人々の注目を集め、いろいろの角度から各種の研究が行われて来た⁸⁾。

先ず初期には神経病理学、組織化学、細胞学の立場からの研究で、特に Nissl および Einarson 等⁵⁾⁸⁾は主として neuron、特に Nissl substance に含まれている核蛋白の動向と neuronal activity との関連を追い、染色性の変化の面からこれを追求した。中でも Einarson は gallocyanin-chromalum method 等を用いて Nissl substance の実在を確かめ、更に chromophilia, chromophobia などの概念を確立した。

一方、電子顕微鏡(以下電顕と省略)の生物分野への応用が進められ、Richards, Steinbach & Anderson 等¹⁵⁾が神経組織の電顕的観察を報告して以来、正常神経細胞に関する多くの人々の業績があり³⁾⁶⁾⁹⁾¹¹⁾¹⁵⁾²⁰⁾²⁵⁾

29)30)31)32)、また最近神経細胞の病的変化を追求する努力もなされている⁴⁾⁷⁾¹⁰⁾¹⁷⁾²¹⁾²⁸⁾³³⁾³⁷⁾。

更に近年組織学的変化と代謝異常——生化学的变化とを結びつけて理解せんとする企ても数多くなされている。Allen¹⁾, Elliott & Pappius²⁶⁾²⁷⁾, Gerschenfeld et al⁴⁾⁷⁾等は incubating brain slice method を用い、生化学的、生理学的な面で多くの優れた業績を報告した。

本実験においても、各種の条件下におかれた神経細胞の形態学的変化を電顕的に把握せんと試みた。ただ neuron に表現される諸変化は、その成立因子が余りにも複雑で数多くの因子が関与し、しかもこれらの因子の解析も容易でないことから、出来るかぎり単純化され、再現性のある条件下で実験を行なうために incubating brain slice method, すなわち in vitro study を行なった。

材料および実験方法

実験動物として成熟ラッテを用い、断頭により直ちに(約5分以内)脳を摘出し、氷冷 Krebs-Ringer 液

に浸しながら、大脳皮質より約0.35~0.40mmの厚さで約40mgの slice を作成した。次いでこの実験のために改良した Warburg の装置 (Fig. 20) を用い、次に示すような 4 種類の条件で incubation を行なつた。

実験 1 : gas phase として O_2 を使用したもの。

実験 2 : gas phase として N_2 を使用したもの。

実験 3 : O_2 および添加物として 2, 4-dinitrophenol (DNP) $2 \times 10^{-4}M$ を使用したもの。

実験 4 : O_2 および acetylcholine (Ach) $10^{-3}M$, eserine $2 \times 10^{-4}M$ を使用したもの。

1) incubation medium として組織培養液を用いたもの。

2) ブドー糖 ($11 \times 10^{-3}M$) を含有せる Krebs-Ringer 液を用いたもの。

尚 incubation medium は 4 種類の実験のすべてに Table 1 の如き組成の組織培養液 (10 ml) を用い、Ach 添加の場合 (実験 4) にのみ ブドー糖 ($11 \times 10^{-3}M$) を含む Krebs-Ringer 液 (10ml) (Table 2) による実験を追加した。使用した添加物は前もつて medi-

um に溶かしておき、また O_2 および N_2 はあらかじめ 15 分間攪拌しながら通気した後、 $30^\circ C$ 、静止状態で通気しながら 15 分、30 分、45 分、60 分の incubation を行ない、適時 slice をとり出した。(Table 3 は上に述べた実験条件をまとめたものである。)

以上により得られた incubated brain slice を 0.1M の phosphate buffer (pH 7.2) を含む 1% (O_3O_4) で固定 (氷室内 2 時間)、アルコール系列にて脱水し、methacrylate (n-butyl : methylmethacrylate = 6 : 4) にて包埋した。

これとは別に、incubation を行なうことなくとり出した slice を直ちに同じ方法にて固定、包埋して神経細胞の正常像とした。

超薄切片作成には Leitz ultramicrotome を使用し、電顕は Hitachi HS-6 型を用いた。

電顕的観察に際しては、slice の表面からの距離を出るだけ一定にするように努め、ひとつの実験条件のものを観察するのに数個のブロックを使用した。

実験結果

A. 大脳皮質神経細胞の正常像

核は胞体のほぼ中央に位置し、円形または楕円形で、時に凹凸の著明な輪郭を示すものもある。核膜は 2 重膜構造をなしており、外側の膜の方が電子密度が小で、時に胞体内に膨出することもある。核質はchromatin の小顆粒が大体において瀰漫性に拡がっているが、ところどころに集合して存在することもある。核小体は電子密度大なる小顆粒の集合体で、限界膜を有していない。

細胞質には rough surfaced endoplasmic reticulum が網状をなして豊富に認められる。その構造は細管状、或いは小胞状をなした限界膜によって取り囲まれており、その内腔は電子密度が小である。またこの膜面の

Table 1 Tissue Culture Medium

human ascitic fluid	50%
chick embryo extract	5%
Gay's balanced saline solution	45%

Table 2 Krebs-Ringer's Solution

NaCl	127mM
KCl	5.1mM
CaCl ₂	2.73mM
KH ₂ PO ₄	1.27mM
MgSO ₄	1.27mM
Tris	50mM
(PH	7.4)
Substrate	11mM

Table 3

Gas phase		Addition (to concentration of)	Incubation Medium	Temperature (°C)	Incubation Time (min)
1	O_2	—	Tissue Culture Medium	30	15, 30 45, 60
2	N_2	—	Tissue Culture Medium	30	15, 30 45, 60
3	O_2	2, 4-Dinitrophenol ($2 \times 10^{-4}M$)	Tissue Culture Medium	30	15, 30 45, 60
4	O_2	Acetylcholine ($10^{-3}M$)	Tissue Culture Medium	30	15, 30 45, 60
		Eserine ($2 \times 10^{-4}M$)	Glucose $11 \times 10^{-3}M$ in Krebs-Ringer's solution		

外側には直径およそ 100A の小顆粒が附着している。この小顆粒は ribosomes, Palade の小顆粒、或は RNA 顆粒などとよばれている。mitochondria は 2 重の薄膜によつて囲まれており、内部には内側限界膜から作られた cristae mitochondriales が通常長軸に直角に並んでいる。Golgi apparatus は Golgi membrane, Golgi vesicle, Golgi vacuole の 3 つの形態を示す部分を有し、その膜の表面には顆粒を有していない。dense body は細胞質内に散在性に存在する電子密度大なる直径 0.2~0.6 μ 程度の小体で、一般に脂質顆粒などとよばれている organelle である。

また細胞質には種々の大きさおよび電子密度を有する顆粒が瀰漫性に散在している。細胞膜も同様に 2 重膜構造を有している。これらの所見は、多くの人々によつて報告されたものと一致している (3)(6)(11)(15)(20)(21)(25)(29)(30)(31)(32) (Fig. 1)。

B. 各種条件下における神経細胞の形態的諸変化 実験 1

15分間の aerobic incubation (以下これを O₂15' の如く省略し、30分間、45分間、60分間 incubate したものを、それぞれ O₂30', O₂45', O₂60' と省略する。)では非常に少数の mitochondria に軽度の膨化が認められる以外はほぼ正常像を示している (Fig. 2)。O₂30' では軽度の膨化像を示す mitochondria の数が増加するが、他には全く変化を認めない (Fig. 3)。O₂45' では mitochondria の大きさおよびその構造に関してやはり軽度の変化が認められ、また endoplasmic reticulum の内腔の軽度擴大などが認められたが、全体としてみるとほぼ正常像に近いものが得られた (Fig. 4, 5)。O₂60' では更に mitochondria および endoplasmic reticulum の変化が強くなり、核質の chromatin 顆粒が一層集合する傾向を示すようになり、核質全体としての電子密度が低下する。また細胞質の顆粒も大きさおよび電子密度を増す傾向が強くなっている (Fig. 6)。

以上の観察結果から、O₂を用いた aerobic incubation では、著明な変化が生じ始めるのは 45分以後であり、それ迄はほぼ in vivo の神経細胞と identical な形態を示すことがわかつたので、以下の実験では 45分 incubate した brain slice を中心として観察し、更により早期に認められた変化も適宜 O₂ incubation のそれと比較検討した。

実験 2

15分間の anaerobic incubation (O₂) の場合と同様に N₂15' と省略し、30分、45分、60分をそれぞれ N₂30',

N₂45', N₂60' と略す。)では神経細胞はほぼ正常像を示した (Fig. 7)。N₂30' では変化を起していない神経細胞も未だ認められるが、多くはかなりはつきりした変化を示しており、mitochondria の膨化、cristae の断裂、endoplasmic matrix の膨化が目立つ。特に注目すべき所見は細胞質顆粒の粗大化と数の増加であり、cell matrix の電子密度はために全体として著明な増加を示したことである (Fig. 8)。

N₂45' になるとその変化は一層著しくなり、細胞質顆粒が集まつて一塊をなす傾向も認められ、一般に cell matrix は瀰漫性に電子密度を増す所見が認められる。核質の chromatin 顆粒は集まつて数個の大きな塊を形成し、核膜の周辺に集合し、残つた部分の核の電子密度が極度に低下している場合も認められる。mitochondria は数が減り、cristae の崩壊、空胞化などが認められ電子密度も低下している。

endoplasmic reticulum はおそらく変化していると思われるが、細胞質全体の電子密度の上昇のために不明瞭になる場合が多い。また一部に核膜の断裂を思わせる所見が認められた (Fig. 9, 10)。

N₂60' では、細胞質は電子密度大なる顆粒によつて殆ど一様にうずめつくされており、細胞質内の organelles の弁別が困難な場合が多い。また一部において神経細胞の縮小、すなわち sclerosis を思わせる像が得られた (Fig. 11)。

実験 3

DNP 添加 medium 中に 15分間 incubate したものは、(同様に DNP 15' の如く省略) 核の chromatin 顆粒は減少し、細胞質の顆粒は瀰漫性に規則正しく分布しているが、個々の顆粒の大きさが正常に比し増加しており、そのため細胞質の電子密度は全体として上昇している。mitochondria は膨化し、cristae の構造にも高度の乱れが生じている。endoplasmic reticulum は内腔の開大が著しい (Fig. 12, 13)。

DNP 45' になると、chromatin 顆粒は減少しているが細胞質顆粒はその数を増し、細胞質の電子密度は更に上昇している。しかしこの DNP 添加の実験では実験 2 の anaerobic incubation の場合にみられた程の高度の変化は認められなかつた (Fig. 14)。しかしやはり両者は同じ方向への変化を示したものと思われる。

実験 4

Ach を加えて 15分間 incubate したもの (以下 Ach 15' の如く省略) では、神経細胞全体の電子密度が低下しており、細胞質内の顆粒はやや大きさを増すが全

体としては数の減少が認められる。mitochondria は膨化し始め、cristae の走行の乱れたもの、matrix の電子密度の低下したものが現われて来る。endoplasmic reticulum の内腔はかなり高度に拡張し、その表面に附着している Palade の小顆粒の数も減少している (Fig. 15)。

Ach 45' では変化は更に進み、核質および細胞質の顆粒は数個が集まって小さな顆粒集合体を形成し、これらが胞体内にまばらに散在している。mitochondria はややその数を増し、その殆どが著しく膨化して形がほぼ円形に近くなるものが多い。cristae の構造が消失し、mitochondria 自体が1つの大きな空腔となつている場合もある。endoplasmic reticulum には特に激しい変化がみられる。すなわちその内腔は開大し、限界膜の断裂を思わせる所見も認められ、膜に附着している Palade の小顆粒も減少している。また dense body はその数を増し、内部に空腔を持つものも存在している (Fig. 16, 17, 18, 19)。

以上の一連の変化を総合してみると、特徴のある所見は endoplasmic reticulum の変化であつて、限界膜の断裂を思わせる程の激しい変化まで現われている。その他では mitochondria の高度の変化および細胞内顆粒の減少などが認められており、これらの所見は chromatolysis に際して認められた電顕像と一致している¹⁰⁾ 15) 21) 25) 29) 33) 37)。また incubation medium として用いた組織培養液とブドウ糖11mMを含む Krebs-Ringer 液とを比較してみると、後者を用いた方が退行性変化が少し強く現われ、細胞中の顆粒が更に減少し、endoplasmic reticulum の変化の度合もやや強くなつている (Fig. 16, 17, 18, 19)。

考 察

近年 incubating brain slice method を用いた研究が盛んに行なわれているが^{11) 41) 26) 27)}、この方法では何といても脳が in vitro にとり出されること、更に組織が in vivo の環境とは異なつた medium に incubate されることなどから生理的状態とは異なつたいろいろな変化を示す。in vitro の方法を用いた実験で、(多くの場合組成の簡単な medium を用いたのであるが) Elliott 等²⁶⁾ は incubation を行なうだけで brain slice の容積が 40% もふえると報告しており、Gerschenfeld 等⁴⁷⁾ は incubation により astrocytes の膨化および神経細胞の形態変化を来すと述べている。

したがつて本実験では in vivo の状態に出来るだけ

近づけるために、条件さえ良ければ神経細胞を長時間 survive せしめ得る組織培養液を medium として使用し、ここに brain slice を incubate した。ただ実験 4 において組成の更にはつきりした Krebs-Ringer 液を medium として用いた実験をも追加した。単純な Krebs-Ringer 液のかわりに組織培養液を用いたことの効用は明らかではないが、aerobic incubation において神経細胞が 45 分ほぼ正常の形態を保持していること、および astrocytes の膨化の程度が共同研究者荻池¹⁸⁾ の Krebs-Ringer 液を用いた実験のそれよりかなり軽度であること、また実験 4 において組織培養液とブドウ糖 11mM を含んだ Krebs-Ringer 液を用いた場合との電顕所見をそれぞれ比較してみると、後者の方が変化の程度が少し強いことなどから判断し、少なくとも組織培養液は isolated brain slice をより生理的条件に近い状態に保ち得るものと想像される。

Nissl および Einarson^{5) 8)} は、神経細胞をその染色物質の分布および排列の面から幾つかの型に分類し、それぞれの型が neuronal activity の 1 時期を表わしていると述べたが、in vivo の条件における神経細胞の観察では関与する要因の余りに多いため必ずしも常に一定の所見が得られない。即ち同一切片においてさえ神経細胞の核の形、核小体の位置、細胞内顆粒の大きさおよび数などによつてかなり variation が認められる。このことは in vitro の状態で種々の条件が与えられた場合の神経細胞の所見に関してもいえることで、ここでもやはり若干の variation が示されている。しかしその程度は in vivo のそれよりも甚しく軽度で、かなり uniform な変化を観察することが出来た。

anaerobic incubation において認められた神経細胞の電顕所見は、光学顕微鏡にみられる所謂 chromophilia の方向への退行性変化を示したものと思われる。即ち、組織化学的に認められた chromophilia と同じく細胞内に含まれる物質の染色性が高められるような方向への変化が起つている事を表わしている。しかも aerobic incubation においては 60 分以上経過して現われ始める変化が anaerobic condition では 30 分ですでに起つているという事である。chromophilia は動物実験では experimental inhibition; vitamin E deficiency; chronic, intermittent, sublethal hypoxia; experimental transneuronal degeneration 等の場合に認められ、また中毒、血管性疾患、変性疾患等の慢性疾患の場合にも観察されている⁵⁾。結局これらの変化は neuronal activity を抑制するような因子 (primary suppression) が神経組織に

働く場合に認められる変化だと考えられる。我々の観察した神経細胞の胞体の α -midensity の増加は、RNA 顆粒の積極的な増加を示すというよりおそらく細胞内物質の利用能力の低下を意味するものであろう。何れにせよ実験2における一連の所見は chromophilia から細胞死に通ずる退行性変化を表わす電顕像と考えられる。もつとも、稀には正常と思われる脳でも所謂 chromophilia の像を示す神経細胞が認められており⁸⁾、このことは電顕的にも観察されているが²¹⁾、このような神経細胞が如何なる機能状態にあるかを正確に知ることは困難である。

N₂ 45'において核膜の断裂を思わせる像が認められたことは、核質の電子密度の低下および細胞質の電子密度の上昇と合わせて興味深い所見であるように思われる。即ち McIlwain²²⁾²³⁾ によれば、核膜の断裂により histone のようなアルカリ性蛋白が胞体に migrate すると脳組織はその electrical excitability を失うに至るとされており、ここに認められた変化も神経細胞の機能状態の一面を反映するものかも知れない。

また N₂ 60' では神経細胞の縮小と細胞質の電子密度の上昇、即ち sclerosis を思わせる像が得られたが、これも注目すべき所見であると考えられる。Einarson⁵⁾ は高度の chromophilia は細胞の sclerosis を結果し、更に変化が進めば核蛋白などの消失を伴った atrophy へと進み、やがて神経細胞の消失が起ると述べている。一方 Gerschenfeld 等⁴⁷⁾ は脳浮腫の研究で神経細胞の同じ変化を報告しており、このような変化は膨化した astrocytes によつて神経細胞が圧縮されたもので、astrocytes と neuron との浸透圧の差によつて起るのであろうと述べている。しかし石井等¹⁷⁾の脳腫脹の電顕的研究によると、astrocytes の高度の腫脹が認められる際でも神経細胞は殆ど正常の形態を示す場合もあり、sclerosis が単なる理学的要因によつて惹き起されるとは一寸考え難い。また同時に認められる高度の mitochondria の変化は、それに含まれている酵素、特に酸化酵素に対する影響、ATP 産生の減少など種々の機能障害を暗示するものと思われる。endoplasmic reticulum の変化を代謝の面から説明することはより一層難かしいが、古くより endoplasmic reticulum が細胞の蛋白合成の場と信じられている事実²⁴⁾³⁶⁾、また McIlwain²²⁾²³⁾の示した事実、即ち neuron の endoplasmic reticulum に含まれる gangliosides が脳皮質の reactivity に関係しているという事、および教室辻²⁾³⁵⁾の最近の報告における、脳圧迫により症状の悪化と一致して gan-

gliosides が減少しているなどの諸事実から考えて、endoplasmic reticulum の形態学的な変化が細胞の機能状態の一端をうかがわせる所見であることも間違いないようである。

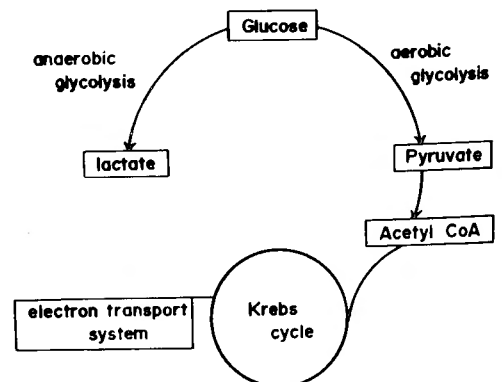
実験3でみられた電顕像における変化は、実験2における anaerobic incubation の場合ほど著しいものではないが、同じ方向への退行性変化を示しているものと考えられる。

これらを生化学的な面からみてみると、DNP の場合には、ブドー糖および Krebs cycle の代謝に必要な substrate が存在しておれば、ブドー糖から始まる代謝系路は常に回転しており、ただ DNP が electron transport system において uncoupler として働くために ATP の形成を阻止しているだけで、他は正常の場合と変らない。

一方、N₂ を用いた場合には、Krebs cycle に入つてから後の代謝過程がスムーズに行なわれないことから、anaerobic glycolysis の結果生じた lactate が蓄積し、ある程度たまるとこれが更に代謝系路の回転を阻止するように働く¹⁹⁾といった差が存在しており、このような代謝様式の差によつて形態学的にも差が生じて来たと考えられる。即ちこの実験3で認められた変化は、細胞の形状および機能を維持するためのエネルギー源とみられる ATP の形成が阻止されることによつて生じたものと結論して良いであろう。(但し ATP の形成が全然行なわれないわけではなく、anaerobic glycolysis の過程でも僅かに ATP は生成される。) (Table 4)

実験4では、endoplasmic reticulum の変化が特徴的である。現在神経細胞における rough surfaced endoplasmic reticulum が Nissl body の構造と一致するとい

Table 4



うことは多くの人々によつて報告されており³⁴⁾³⁶⁾、高度の endoplasmic reticulum の変化と Nissl body の染色性の変化、即ち chromatolysis とが同じ変化をさしている事は先ず間違いないと信じられる。したがつて、実験4では chromatolysis の際にみられる神経細胞の変化を観察したわけである。chromatolysis の概念は多くの人々によつて説明されているように、neuronal activity が何らかの原因により異常に高められた結果、Nissl body中のRNAが減少し、あるいは消失し、(RNA の exhaustion) それに伴なつて染色性の低下が起るのであつて、neuronal degeneration の1つの型である⁵⁾。また chromatolysis は末梢神経切断後に逆行性に認められる他⁸⁾¹⁵⁾³³⁾、神経細胞自身に損傷が加わつても起り⁸⁾、電気ショック³⁷⁾、線照射²⁸⁾、頭部外傷²¹⁾、脳浮腫作成¹⁰⁾などの種々の実験において起るといわれている。この場合の電顕像は endoplasmic reticulum および mitochondria の変化として現われると報告されている¹⁵⁾。一方、Hydén¹⁶⁾は神経組織が持続的に刺激されると神経細胞の蛋白含量が低下し、この低下は RNA 含量の減少にはほぼ平行する事を生化学的な実験から結論した。

本実験で使用された Ach は、他の多くの実験にもみられるように stimulants として用いたものである。Hokin¹²⁾¹³⁾¹⁴⁾は Ach が eserine の存在のもとに、microsomal fraction、主として endoplasmic reticulum に作用して、その中に含まれている phosphatidic acid の turnover を高めている事を示唆している。何れにせよ Ach の刺激作用によつて endoplasmic reticulum において行なわれる代謝過程に変化を来し、おそらく labile-RNA granules の急速な消費を結果し、その結果所謂 chromatolysis を惹き起したものと考えられる。

mitochondria の変化も著しい。Hokin¹²⁾は mitochondria に対する Ach の刺激作用は、おそらく microsomal fraction に対する作用を通じて行なわれるのであらうと述べており、本実験で認められた mitochondria の変化もあるいはこれで説明出来るかも知れない。

以上電顕によつて得られた神経細胞の形態学的な変化と、従来よく調べられている組織化学的な変化とを対比し、更にまたこれらを生化学の立場から説明せんと試みたが、現在の段階では、我々の得ている限られた知見からその詳細について解析し、それぞれの間のギャップを十分に埋めつくす事は不可能である。しかし神経細胞にみられる退行性変化の2つの表現、即ち chromophilia あるいは sclerosis と chromatolysis なる

現象は、1つは primary suppression から、他は hyperactivity あるいは exhaustion を通じて起る事をはつきりと確認したことは1つの収穫であつた。

現在特に脂質代謝と核蛋白代謝に関する研究が数多く行なわれており、最近の生化学および生理学の著しい進歩からすれば、近い将来これら神経細胞の代謝の全貌が明らかにされるであらう。

本実験は神経細胞の機能と形態の関連性に関して一部にある解答を与えたものと思われ、特に external noxious agents の差によつて形態学的にそれに対応した変性像が現われる事を示した。

結 語

ラッテを用い、断頭により得た脳から brain slice を作成し、これを4種類の条件の medium 中に孵置した後、各条件下に起つた大脳皮質神経細胞の変化を逐時的に観察して次の結論を得た。

1) aerobic incubation では神経細胞は45分迄は正常像を示した。

2) N₂ を用いた anaerobic incubation では、神経細胞は30分から変化を始め、mitochondria の変化、胞体の電子密度の上昇、核膜の断裂を思わせる所見、更には神経細胞の縮小を思わせる像などが得られ、chromophilia から sclerosis、細胞死に至る退行性変化が証明された。

3) DNP を用いた場合の変化は、anaerobic incubation でみられた変化ほど強くはないが、やはりそれと同じ方向への変化を示した。

4) Ach により刺激を行なうと、endoplasmic reticulum および mitochondria の高度の変化が認められ、また光学顕微鏡で示された chromatolysis と一致した電顕所見が得られた。組織培養液を用いた場合とブドウ糖11mMを含む Krebs-Ringer 液を用いた場合とを比較してみると、後者においてやや変化が強いことが認められた。

5) 同じく細胞死に通ずる神経細胞の2つの退行性変化、即ち chromophilia および chromatolysis は、前者が primary suppression により、後者が hyperactive exhaustion によつて起るであらう事が判明した。

稿を終るに臨み、終始懇切なる御指導および御校閲を賜つた石井昌三博士にあつく感謝致します。

参 考 文 献

- 1) Allen, J. N. : Extracellular space in the central nervous system. *A. M. A. Arch. Neurol. Psychiat.*, **73** : 241, 1955.
- 2) 荒木千里, 石井昌三, 近藤祐之, 沼正作, 小沢和恵, 辻宏 : 外傷脳および硬塞脳における脂質代謝および核酸誘導物質の治療面への応用. *神経研究の進歩*, **8** : 82, 1961.
- 3) Barton, A. A., and Causey, G. : Electron microscopic study of the superior cervical ganglion. *J. Anat.* **92** : 399, 1958.
- 4) De Robertis, E. D., and Gerschenfeld, H. M. : Functional significance of astroglia ; Submicroscopic morphology and function of glial cells. *International review of neurobiology*. Academic Press, New York & London, 1961.
- 5) Einarson, L. : Nucleic acids as structural constituents of nerve cells ; Modern scientific aspects of neurology. Edward Arnold Publishers, London, 1960.
- 6) Fernández-Morán, H. : Electron microscopy of nervous tissue, in metabolism of the nervous system. Pergamon Press, London, 1957.
- 7) Gerschenfeld, H. M., Walz, F., Zadunaisky, J. A. and De Robertis, E. D. : Function of astroglia in the water-ion metabolism of the central nervous system : An electron microscope study. *Neurol.*, **9** : 6, 1959.
- 8) Greenfield, J. G. : *Neuropathology*. Edward Arnold Publishers, London, 1958.
- 9) Hartman, J. F. : Electron microscopy of mitochondria in the central nervous system. *J. Biophysic. Biochem. Cytol.*, **2** : 375, 1956.
- 10) 早石 修, 小沢和恵, 荒木千里, 石井昌三, 近藤祐之 : 脳外傷および脳浮腫の生化学. *日新医学*, **48** : 915, 1961.
- 11) Hesse, A. : The fine structure of nerve cells and fibers, neuroglia and sheaths of the ganglion chain in the cockroach. *J. Biophysic. Biochem. Cytol.*, **4** : 731, 1958.
- 12) Hokin, L. E., and Hokin, M. R. : Acetylcholine and the exchange of phosphate in phosphatidic acid in brain microsomes. *J. Biol. Chem.*, **233** : 822, 1958.
- 13) Hokin, L. E., and Hokin, M. R. : The role of phosphatides in active transport with particular reference to sodium transport ; Drugs and membranes, *Proceedings of first international pharmacological meeting*. Pergamon Press, London, 1963.
- 14) Hokin, L. E., and Hokin, M. R. : Effects of acetylcholine on phospholipides of brain cortex in vitro. *Biochim. et Biophys. Acta*, **16** : 229, 1955.
- 15) 本陣良平 : 神経組織一般の電子顕微鏡像. *脳と神経*, **12** : 5, 1960.
- 16) Hydén, H. : Protein metabolism in the nerve cell during growth and function. *Act. Physiol. Scandinav.*, **6** : Suppl. 17, 1943.
- 17) Ishii, S., and Tani, E. : Electron microscopic study of the blood-brain-barrier in brain swelling. *Act. Neuropath.*, **1** : 474, 1962.
- 18) 菊池晴彦 : in vitro における脳腫脹の電子顕微鏡的研究. 未発表.
- 19) Lowry, O. H., Passonneau, J. V., Hasselberger, F. X., and Schniz, D. W. : Effect of ischaemia on known substrates and cofactors of the glycolytic pathway in brain. *J. Biol. Chem.*, **239** : 18, 1964.
- 20) Luse, S. A. : Electron microscopic observation of the central nervous system. *J. Biophysic. Biochem. Cytol.*, **2** : 531, 1956.
- 21) 牧田泰正 : 実験的頭部外傷による神経細胞の変化の電子顕微鏡的研究. *日外宝*, **31** : 822, 1962.
- 22) McIlwain, H. : Protein interactions and metabolic response to stimulating agents in isolated cerebral tissues : Histones as inhibitors. *Biochem. J.*, **73** : 514, 1959.
- 23) McIlwain, H. : Characterization of naturally occurring materials which restore excitability to isolated cerebral tissues. *Biochem. J.*, **78** : 24, 1961.
- 24) 三浦謹一郎 : 核酸の化学, 現代化学シリーズ 13. 東京化学同人, 東京, 1962.
- 25) Palay, S. L., and Palade, G. E. : The fine structure of neurons. *J. Biophysic. Biochem. Cytol.*, **1** : 68, 1955.
- 26) Pappius, H. M., and Elliott, K. A. C. : Water distribution in incubated brain slices of brain and other tissues. *Canad. J. Biochem. Physiol.*, **34** : 1007, 1956.
- 27) Pappius, H. M., and Elliott, K. A. C. : Factors affecting the potassium content of incubated brain slices. *Canad. J. Biochem. Physiol.*, **34** : 1053, 1956.
- 28) Pitcock, J. A. : An electron microscopic study of acute radiation injury of the rat brain. *Laborat. Investigat.*, **2** : 32, 1962.
- 29) Roizin, L., and Dmochowski, L. : Comparative histologic and electron microscope investigations of the central nervous system. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **15** : 12, 1956.
- 30) Rosenbluth, J., and Palay, S. L. : The fine structure of nerve cell bodies and their myelin sheaths in the eighth nerve ganglion of the goldfish. *J. Biophysic. Biochem. Cytol.*, **9** : 853, 1961.

- 31) Rosenbluth, J.: The fine structure of acoustic ganglia in the rat. *J. Cell Biol.*, **12** : 329, 1962.
- 32) Schulz, R. L., Maynord, E. A., and Pease, D. C.: Electron microscopy of neurons and neuroglia of cerebral cortex and corpus callosum. *Am. J. Anat.*, **100** : 369, 1957.
- 33) Smith, K. R.: The fine structure of neurons of dorsal root ganglion after stimulating or cutting the sciatic nerve. *J. Comp. Neurol.*, **116** : 103, 1961.
- 34) Smith, S. W.: Fine structure of Nissl bodies in sympathetic neurons of a lizard. *Anat. Rec.*, **130** : 373, 1958.
- 35) Tsuji, H.: Lipids metabolism in the cerebral edema. Glycolipids metabolism in the experimentally produced cerebral edema. *Arch. Japan. Chirurg.*, **33** : 995, 1964.
- 36) Wilson, G. B., and Morrison, J. H.: *Cytology*. Chapman & Hall, London, 1961.
- 37) 吉田三彦: 正常および実験的癲癇における小脳皮質の電子顕微鏡学的研究. *久留米医誌*, **24** : 1117, 1961.

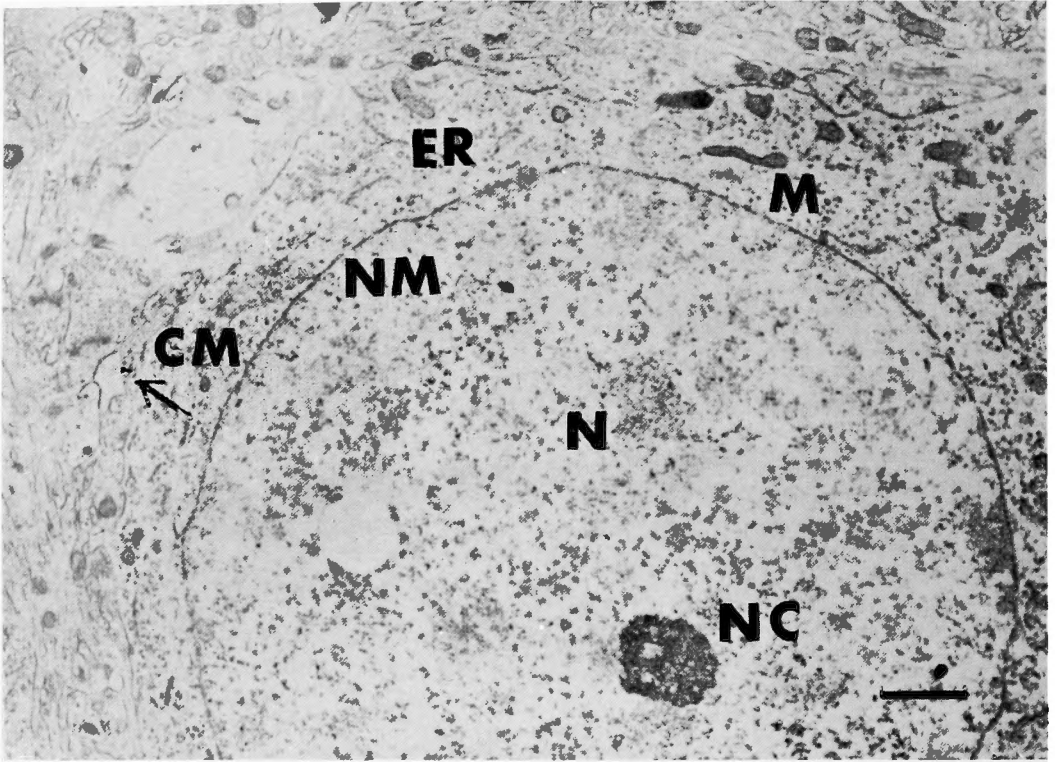


Fig. 1 Normal cortical nerve cell.

× 12,000

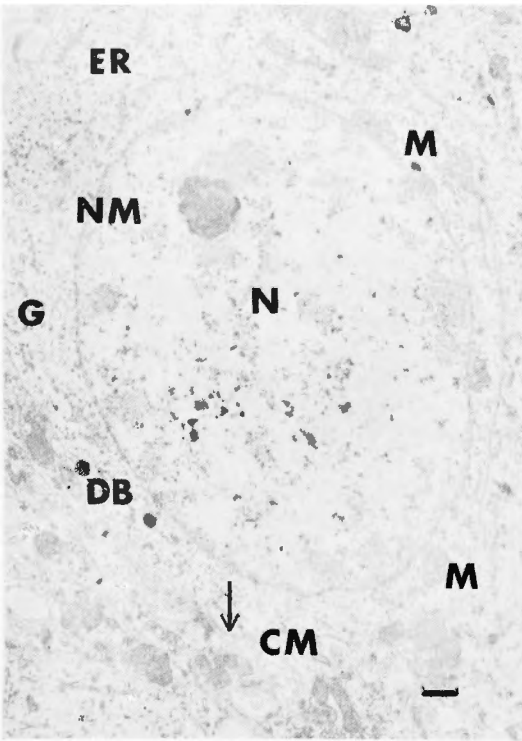


Fig. 2 Incubated for 15 min. under O₂ influx.

× 3,500

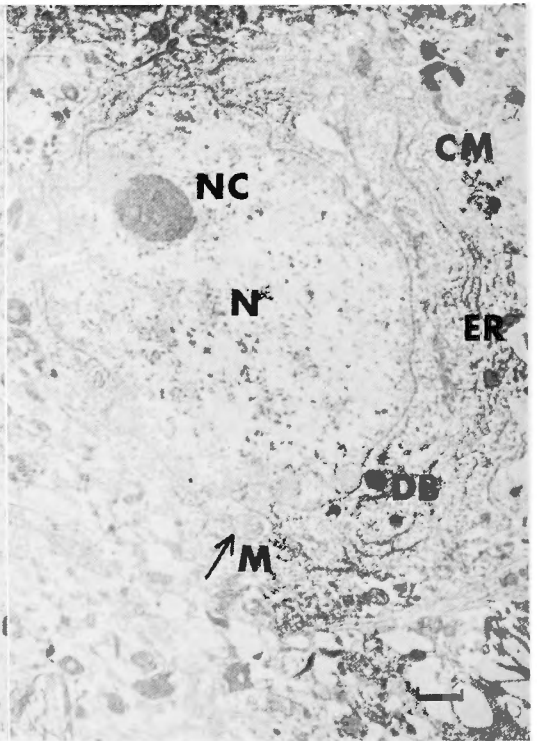


Fig. 3 Incubated for 30 min. under O₂ influx.

× 4,500

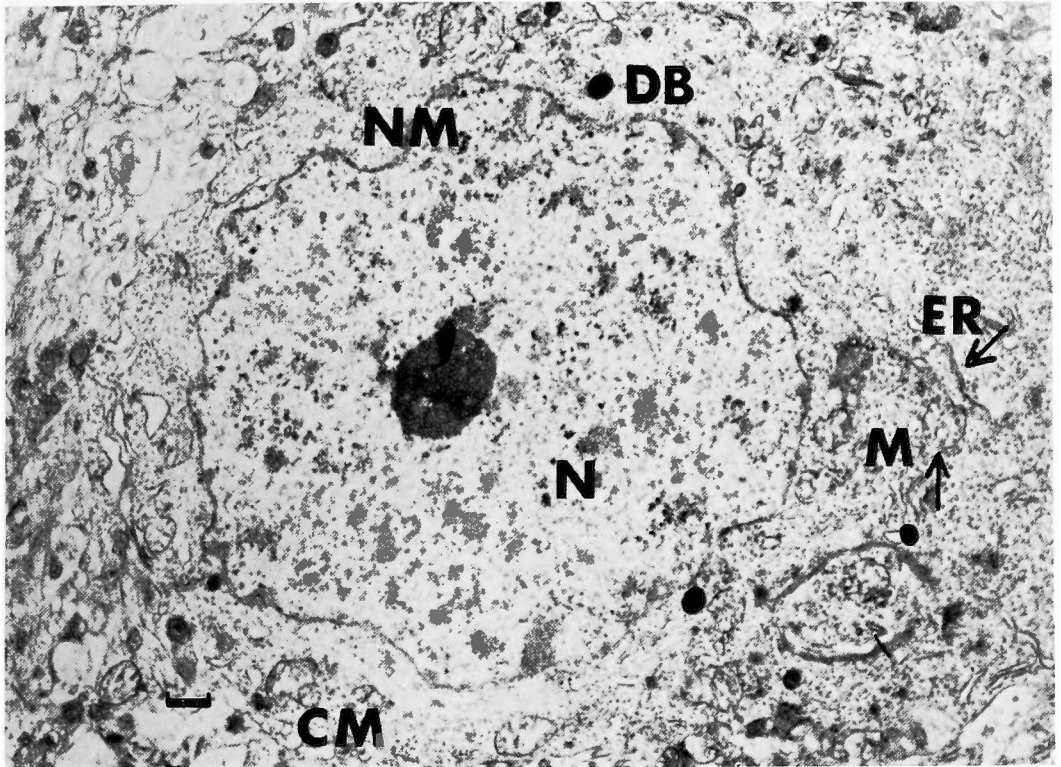


Fig. 4 Incubated for 45 min. under O_2 influx.

× 6,000

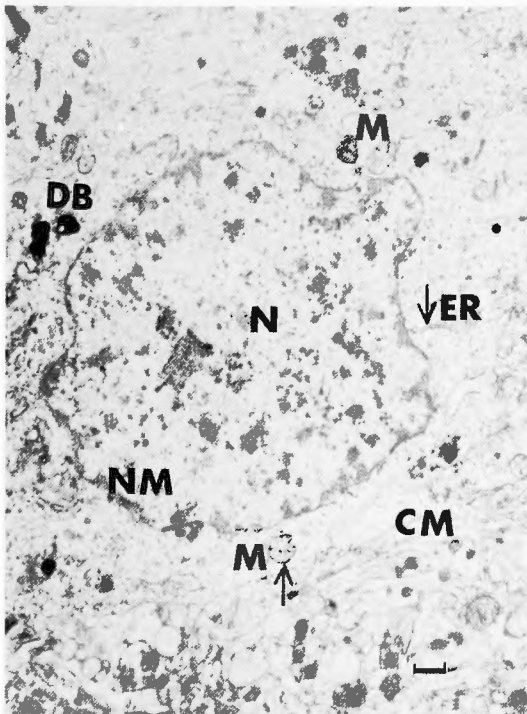


Fig. 5 Incubated for 45 min. under O_2 influx.

× 3,000

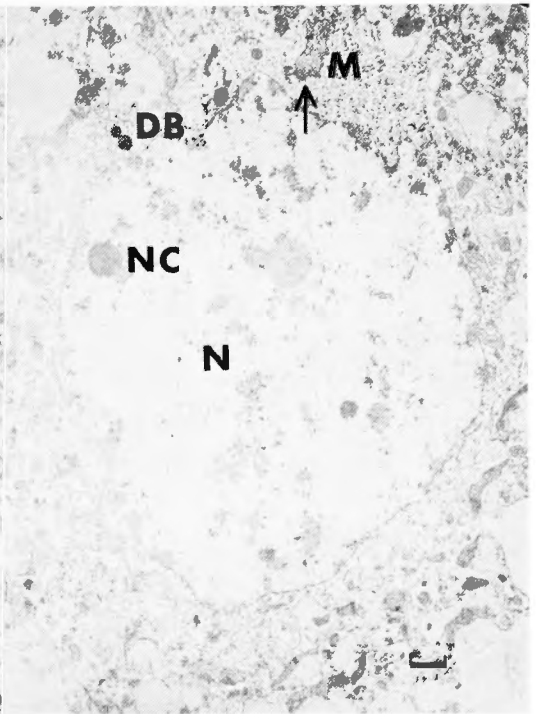


Fig. 6 Incubated for 60 min. under O_2 influx.

× 3,500

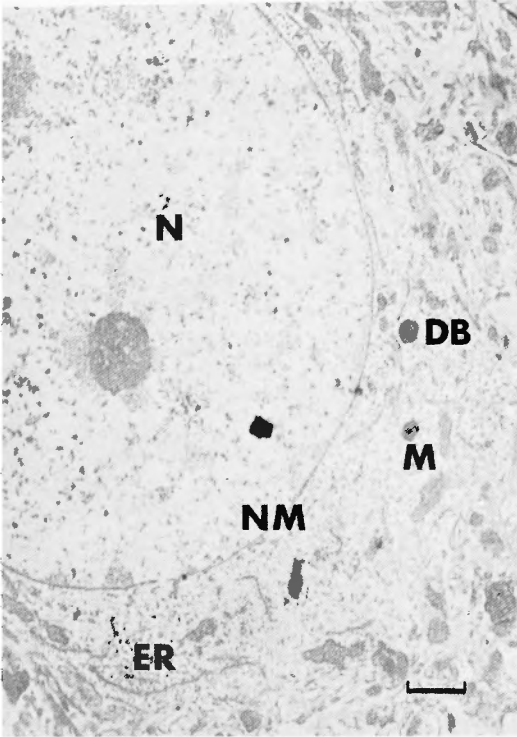


Fig. 7 Incubated for 15 min. under N_2 influx.
 $\times 6,000$

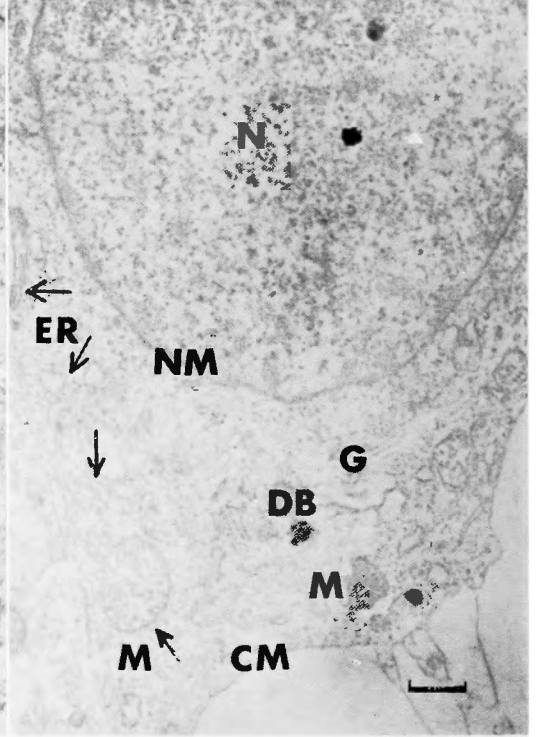


Fig. 8 Incubated for 30 min. under N_2 influx.
 $\times 7,000$

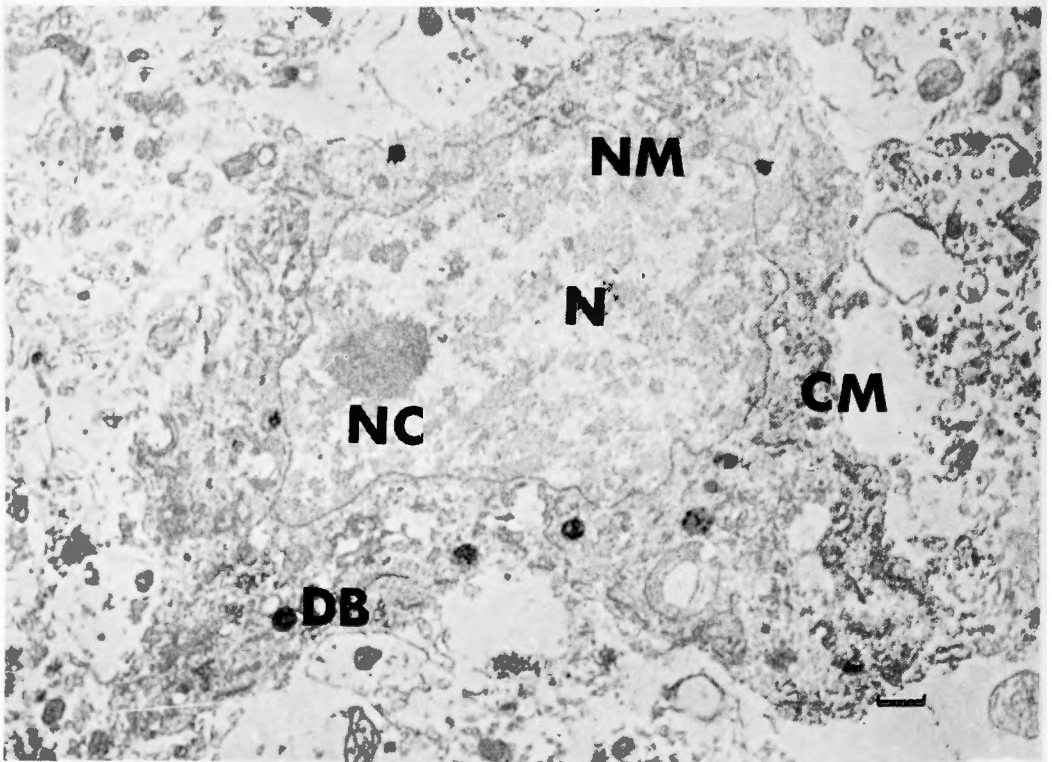


Fig. 9 Incubated for 45 min. under N_2 influx.
 $\times 7,000$

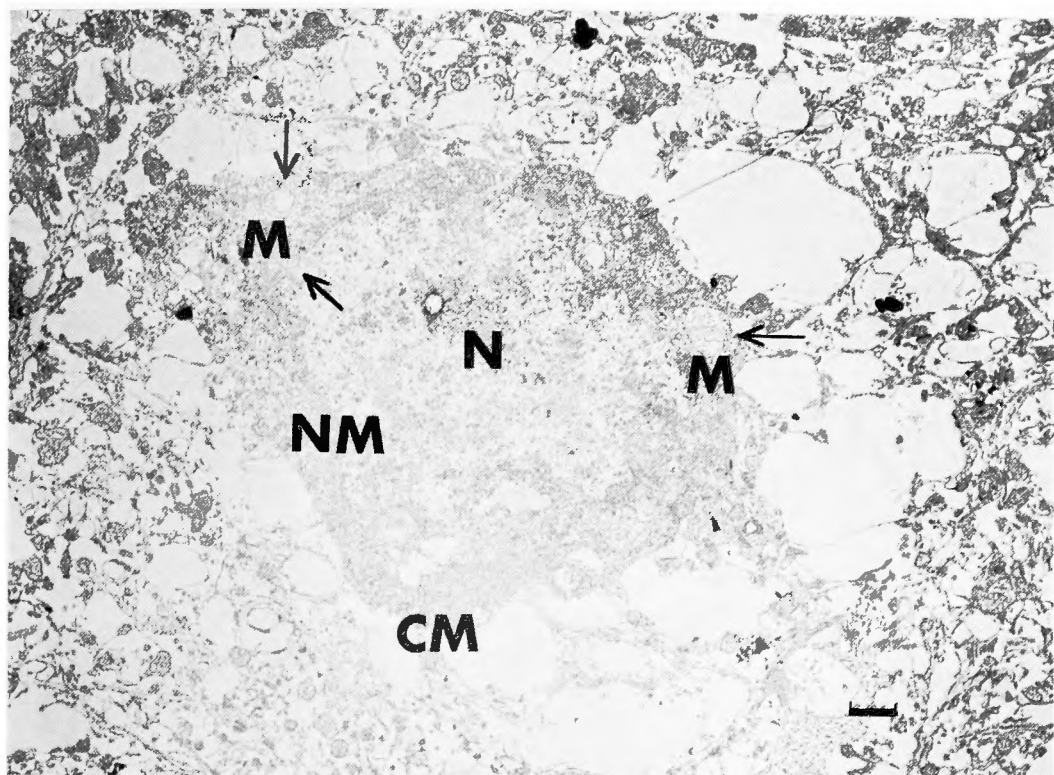


Fig. 10 Incubated for 45 min. under N₂ influx.

× 7,000

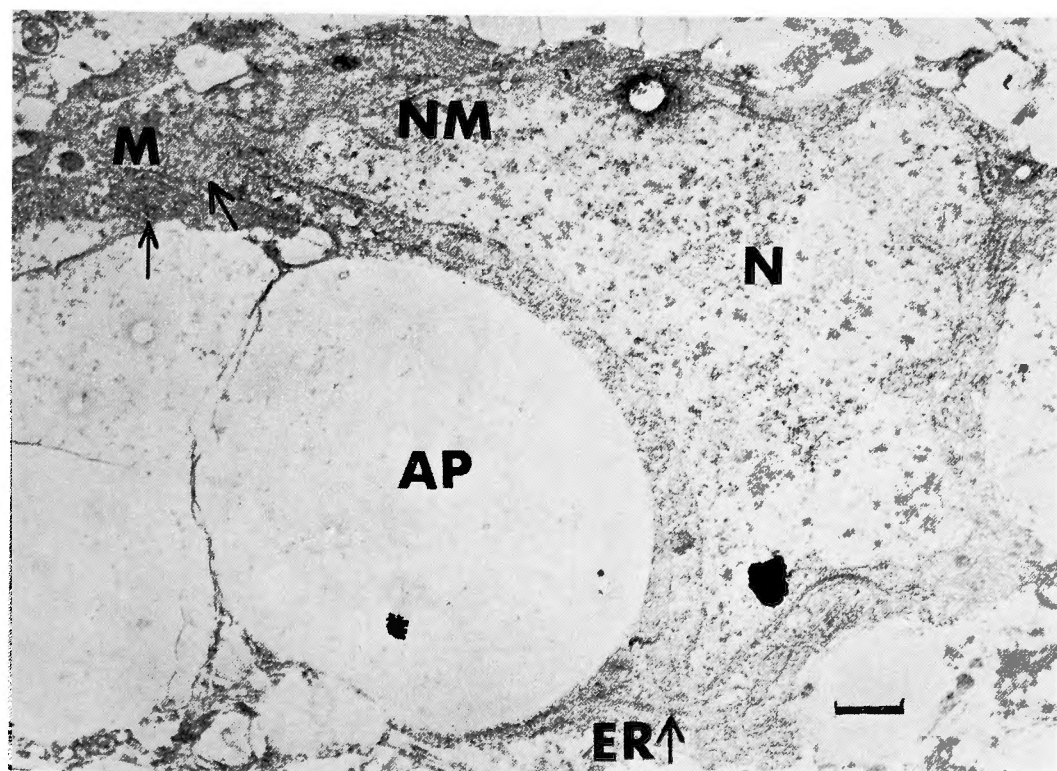


Fig. 11 Incubated for 60 min. under N₂ influx.

× 10,500

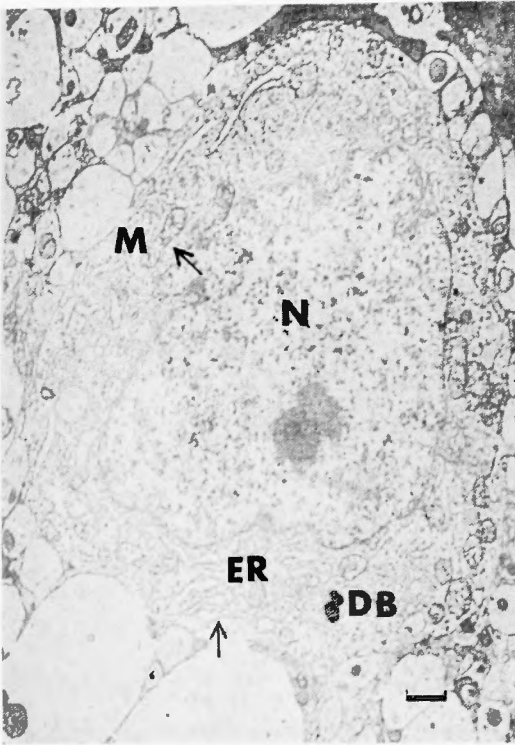


Fig. 12 DNP added incubation for 15 min.
under O_2 influx. $\times 4,000$

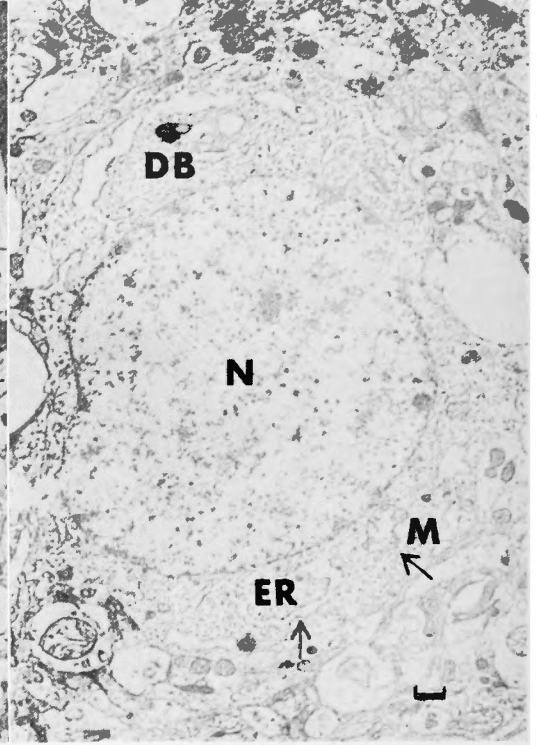


Fig. 13 DNP added incubation for 15 min.
under O_2 influx. $\times 3,000$

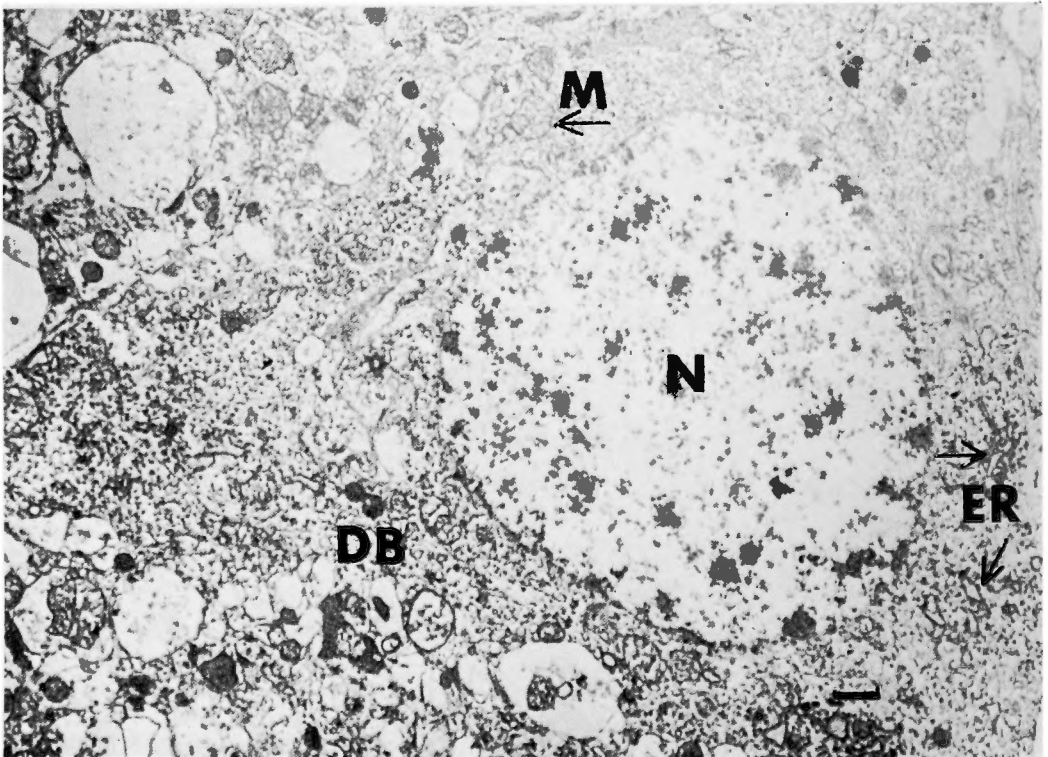


Fig. 14 DNP added incubation for 45 min. under O_2 influx. $\times 6,000$

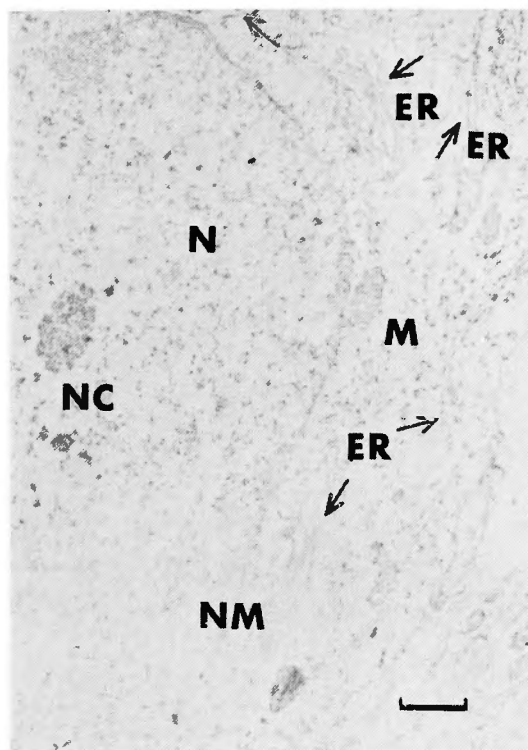


Fig. 15 ACh added incubation for 15 min. under O_2 influx. $\times 7,000$

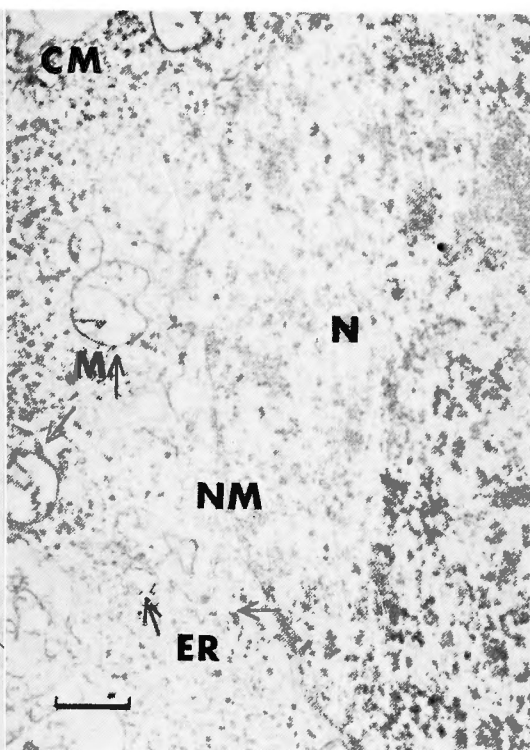


Fig. 16 ACh added incubation for 45 min. under O_2 influx. $\times 7,500$

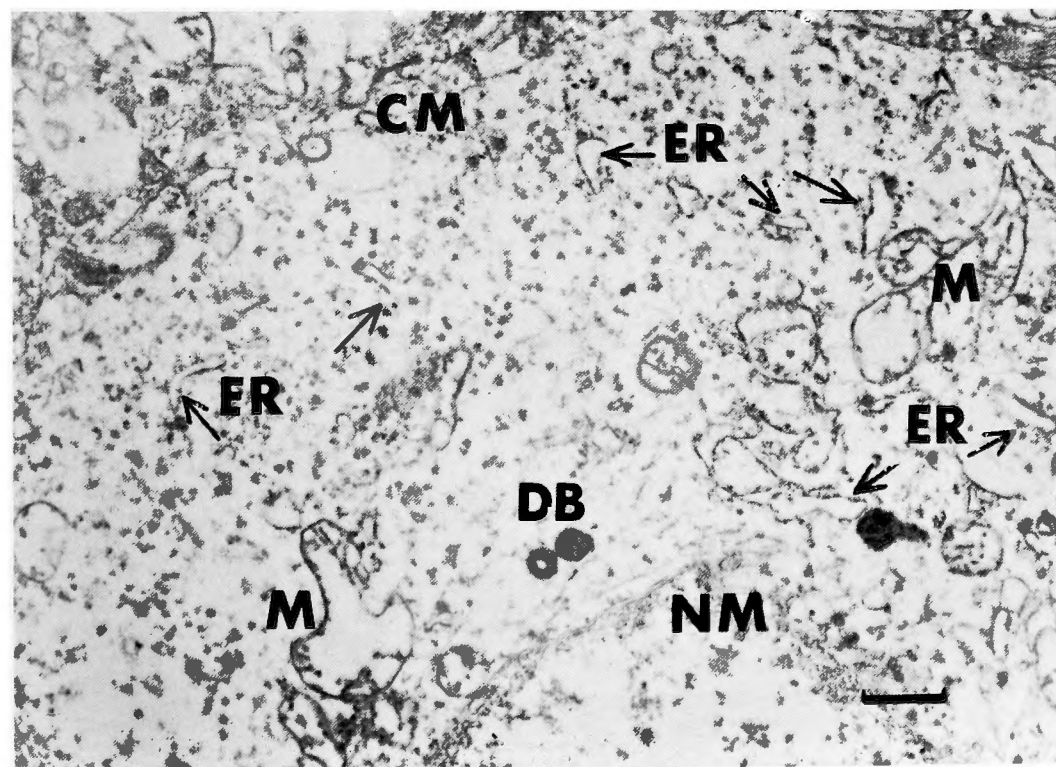


Fig. 17 ACh added incubation for 45 min. under O_2 influx.

$\times 12,250$

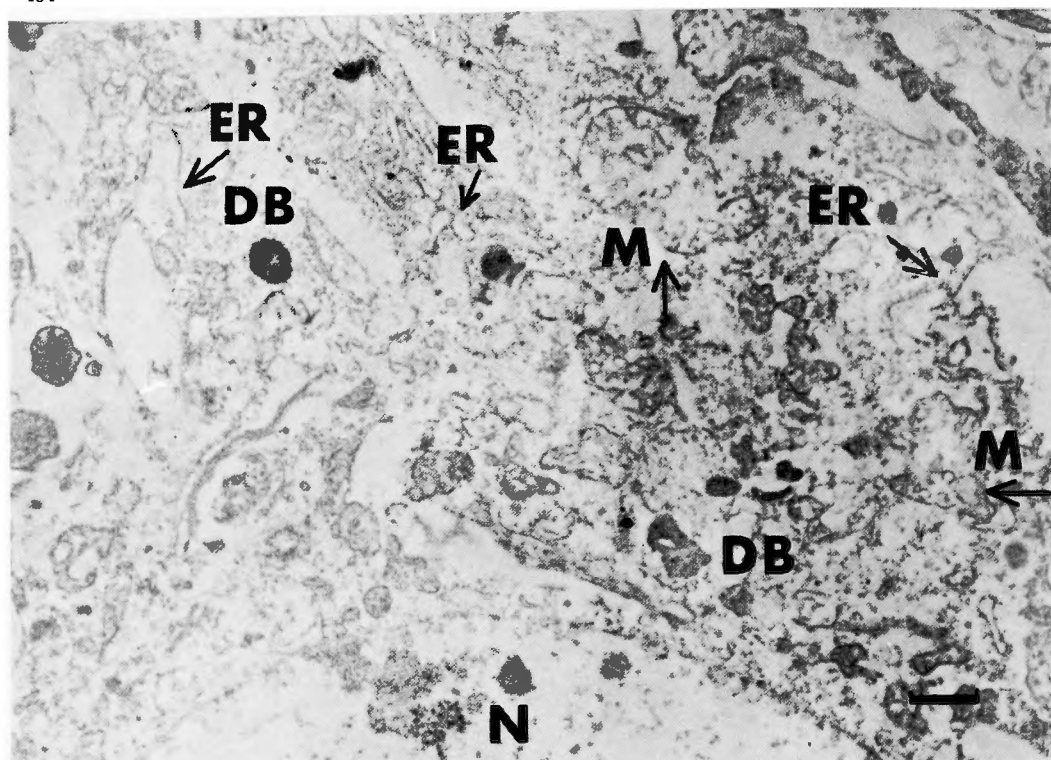


Fig. 18 ACh added incubation for 45 min. under O₂ influx. Krebs-Ringer's solution containing glucose 11 mM was used for the incubation medium. $\times 9,000$

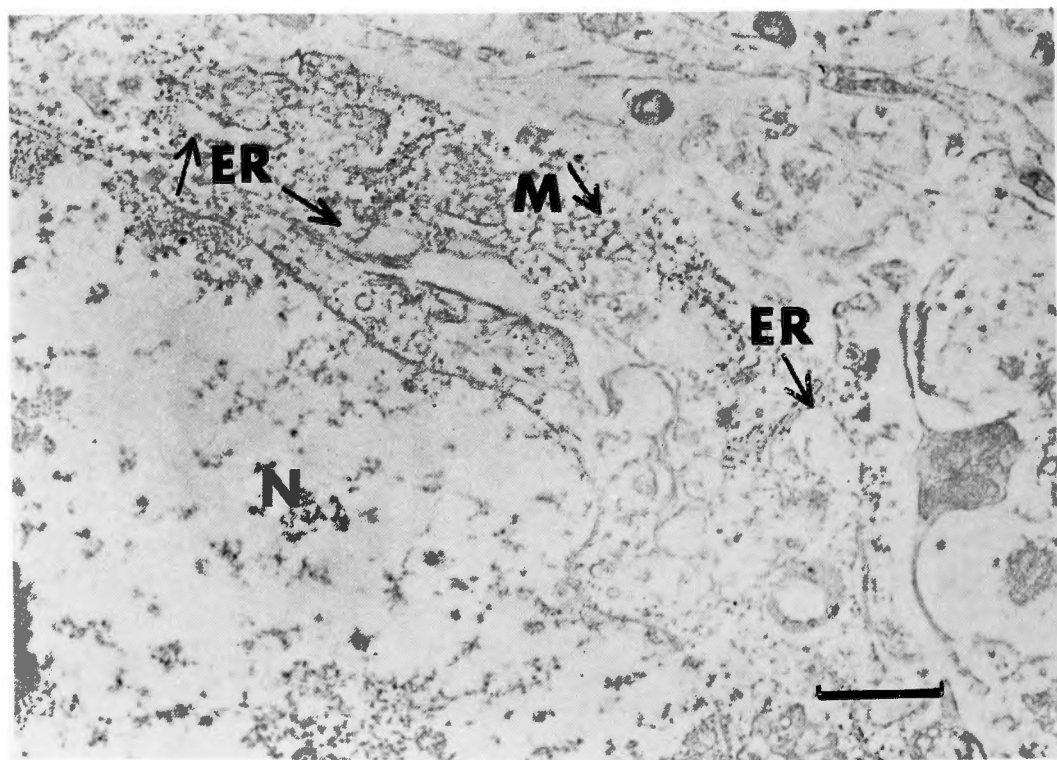


Fig. 19 ACh added incubation for 45 min. under O₂ influx. Krebs-Ringer's solution containing glucose 11 mM was used for the incubation medium. $\times 18,000$

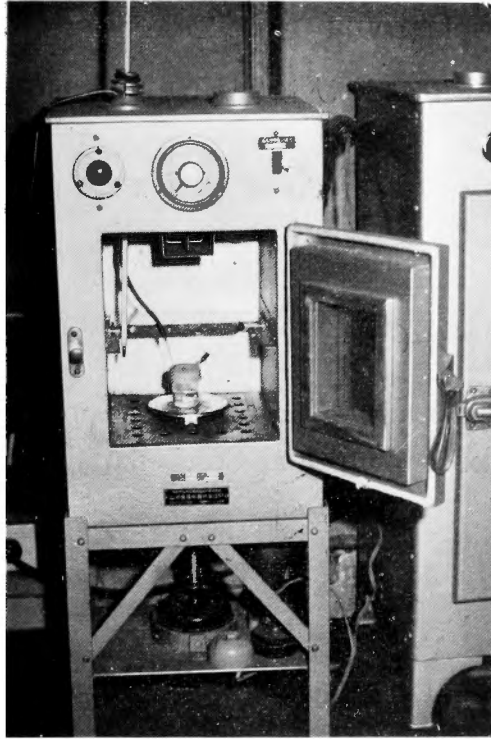


Fig. 20 Modified Warburg's apparatus.

N : nucleus
NC : nucleolus
NM : nuclear membrane
M : mitochondria
ER : endoplasmic reticulum
DB : dense body
G : Golgi apparatus
CM : cell membrane
AP : astrocytic process

(各写真のスケールは、 1μ を表す)